UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Biotecnología - Curso 2024/25





Estudio proteómico de vesículas extracelulares de plasma de individuos con Alzheimer



Tutoras:

Dra. Inmaculada Cuchillo Ibáñez

Dra. Rocío Pérez González

Instituto de Neurociencias de San Juan de Alicante &

Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Ciencias Experimentales

ÍNDICE

1.	I	NTRODUCCIÓN			
	1.1.	La	enfermedad de Alzheimer	2	
	1	.1.1.	La mutación paisa (<i>PSEN1</i> E280A)	3	
	1.2.	Ve	sículas extracelulares (VEs)	4	
	1	.2.1.	Implicación de las VEs en la enfermedad de Alzheimer	5	
2.	Α	NTEC	DENTES Y OBJETIVOS	7	
3.	N	MATERIALES Y MÉTODOS		8	
	3.1.	Mu	iestras biológicas	8	
	3.2.	Со	mposición y preparación de disoluciones experimentales	8	
	3	.2.1.	Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	8	
	3	.2.2.	Western Blot (WB)	8	
	3	.2.3.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	10	
	3.3.	Ais	lamiento de VEs mediante SEC	10	
	3.4.	Cu	antificación de proteínas mediante espectrofotometría (NanoDrop)	12	
	3.5.	Со	mbinación y concentración de fracciones enriquecidas en VEs	12	
	3.6.	Va	idación de marcadores de VEs mediante WB	12	
	3.7.	An	álisis proteómico	14	
	3	.7.1.	Preparación de muestras y adquisición de datos mediante espectrometría de masas	14	
	3	.7.2.	Análisis bioinformático de datos proteómicos	14	
	3.8.	Va	lidación experimental de proteínas de interés	15	
	3	.8.1.	Análisis de apoC3	15	
	3	.8.2.	Análisis de apoE	16	
	3.9.	Lo	calización intra o extravesicular de apoE mediante tratamiento con proteinasa K	16	
4.	R	RESULTADOS			
	4.1.	Ais	lamiento de VEs mediante SEC	18	
	4.2.	Cu	antificación proteica de fracciones por espectrofotometría (NanoDrop)	18	
	4.3.	Va	lidación de la presencia de VEs por WB	19	
	4.4.	Análisis proteómico		19	
	4	.4.1.	Proteínas diferencialmente expresadas y distribución por grupos	19	
	4.4.2.		Análisis de rutas biológicas, compartimentos celulares y enfermedades asociadas	21	
	4	.4.3.	Proteínas relacionadas con alzheimer identificadas mediante análisis bioinformático	26	
	4.5.	Va	lidación experimental de proteínas clave	27	
	4	.5.1.	Resultados de apoC3	27	
	4	.5.2.	Resultados de apoE: Validación y evaluación de su localización intra o extravesicular	28	
5.	D	DISCUSIÓN			
6.	C	ONCL	JSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	33	
7.	В	IBLIO	GRAFÍA	35	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre una neurona sana y una afectada por alzheimer 2
Figura 2. Esquema simplificado de la biogénesis de exosomas y microvesículas
Figura 3. Perfil de absorbancia por fracción en los tres grupos analizados
Figura 4. Detección de marcadores de VEs por WB 19
Figura 5. Volcano plots de comparaciones entre grupos y diagrama de Venn de proteínas detectadas 20
Figura 6. Enriquecimiento de procesos biológicos (Gene Ontology) en el análisis global
Figura 7. Enriquecimiento de procesos biológicos (<i>Gene Ontology</i>) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y control
Figura 8. Red de interacción funcional de proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y controles 23
Figura 9. Enriquecimiento de componentes celulares (<i>Gene Ontology</i>) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y DCL 24
Figura 10. Enriquecimiento de procesos biológicos (<i>Gene Ontology</i>) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre DCL y control
Figura 11. Enriquecimiento de asociaciones gen-enfermedad (<i>DISEASES</i>) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre DCL y control
Figura 12. Validación de los niveles de apoC3 en los tres grupos de estudio (sano, control y DCL) mediante ELISA
Figura 13. Validación de los niveles de apoE en los tres grupos de estudio (sano, control y DCL) mediante WB
Figura 14. Localización de apoE intra o extravesicular mediante WB

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Las vesículas extracelulares (VEs), consideradas fuentes prometedoras de biomarcadores para enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer, fueron analizadas en este Trabajo Fin de Grado (TFG) con el objetivo de estudiar su perfil proteico en plasma de tres grupos: controles no portadores, portadores sanos de la mutación *PSEN1* E280A y portadores con deterioro cognitivo leve (DCL). Para ello, las VEs se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se validaron por *Western Blot*, observándose diferencias en la distribución de proteínas que podrían deberse a variaciones en el tamaño o la concentración vesicular, o bien al co-aislamiento de partículas plasmáticas, como las lipoproteínas. Posteriormente, se estudió su contenido mediante espectrometría de masas, identificando 502 proteínas, con diferencias relevantes entre grupos. El análisis funcional de estas proteínas reveló alteraciones en rutas relacionadas con el sistema inmune, el sistema del complemento y el metabolismo lipídico. Entre las proteínas diferencialmente expresadas, se seleccionaron apoC3 y apoE para su validación experimental. En el caso de apoC3, se observaron niveles más elevados en portadores con y sin deterioro, aunque sin diferencias significativas, en contraste con el análisis proteómico. Por su parte, apoE mostró un patrón coherente entre lo proteómico y la validación, con mayor expresión en controles. Este resultado podría explicarse por la presencia de lipoproteínas en ese grupo, lo que coincidiría con la localización extracelular de ApoE que se ha puesto de manifiesto tras el tratamiento con proteinasa K.

Palabras clave: Vesículas extracelulares, Proteómica, Alzheimer, Mutación PSEN1 E280A, apoE

UNIVERSITAS Miguel Hernand

ABSTRACT AND KEYWORDS

Extracellular vesicles (EVs), considered promising sources of biomarkers for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, were analyzed in this Final Degree Project (FDP) to study their proteomic profile in plasma from three groups: non-carrier controls, healthy carriers of the *PSEN1* E280A mutation, and carriers with mild cognitive impairment (MCI). For this, EVs were isolated by size exclusion chromatography and validated by Western Blot, revealing differences in protein distribution that could be due to variations in EVs size or concentration, or to the co-isolation of plasma particles such as lipoproteins. Subsequently, their content was analyzed by mass spectrometry, identifying 502 proteins with relevant differences between groups. Functional analysis of these proteins revealed alterations in pathways related to the immune system, the complement cascade, and lipid metabolism. Among the differentially expressed proteins, apoC3 and apoE were selected for experimental validation. ApoC3 levels were observed to be higher in carriers with and without impairment, although without significant differences, contrasting with the proteomic analysis. In turn, apoE showed a consistent pattern between the proteomic data and validation, with higher expression in controls. This result could be explained by the presence of lipoproteins in that group, which would be consistent with the extracellular localization of ApoE that we have demonstrated after the proteinase K treatment.

Keywords: Extracellular vesicles, Proteomics, Alzheimer, PSEN1 E280A mutation, apoE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia a nivel mundial y constituye uno de los principales retos sanitarios del siglo XXI, especialmente en el contexto del envejecimiento global de la población (Scheltens et al., 2016; Villar-Vesga et al., 2020). Se trata de un trastorno neurodegenerativo progresivo que se manifiesta a través de un deterioro cognitivo y funcional, acompañado frecuentemente por síntomas neuropsiquiátricos (Cummings, 2021). A pesar de los avances en el conocimiento de la enfermedad, todavía no existe un tratamiento capaz de curarla o frenar su progresión. Además, aunque se han desarrollado distintos biomarcadores, los de tipo sistémico aún no cuentan con una validación suficiente para su uso rutinario en el diagnóstico clínico (Villar-Vesga et al., 2020).

Desde el punto de vista neuropatológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de depósitos extracelulares de beta-amiloide (Aβ) y de proteína tau hiperfosforilada, que dan lugar, respectivamente, a las placas amiloides y a los ovillos neurofibrilares (NFTs) en el cerebro (Figura 1). Estos depósitos van acompañados de diversas alteraciones celulares y sistémicas, como neuroinflamación, disfunción sináptica, trastornos mitocondriales y bioenergéticos, cambios epigenéticos y anomalías vasculares, que contribuyen a la progresiva degeneración neuronal. Este deterioro estructural y funcional del sistema nervioso constituye la base de las alteraciones cognitivas y conductuales que caracterizan la enfermedad (Abdelnour et al., 2022; Cummings, 2021).



Figura 1. Comparación entre una neurona sana y una afectada por alzheimer. En condiciones normales (izquierda), la proteína tau estabiliza los microtúbulos axonales y permite el transporte intracelular. En alzheimer (AD; derecha), la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares (NFTs) desestabiliza los microtúbulos, altera la estructura neuronal y contribuye a la disfunción sináptica y a la neurodegeneración (Brunden et al., 2009; Querfurth & LaFerla, 2010). *Imagen modificada a partir de plantilla de BioRender (Team, B., 2019).*

Bajo el enfoque clínico, la enfermedad de Alzheimer suele comenzar con alteraciones en la memoria reciente y un deterioro cognitivo progresivo que, con el tiempo, puede afectar al lenguaje, la conducta, la orientación visoespacial o las habilidades motoras (DeTure & Dickson, 2019). Estos síntomas pueden ir acompañados, incluso en fases tempranas, de manifestaciones como apatía, ansiedad o depresión, así como desorientación, confusión y dificultades en la comunicación o el habla, en etapas más avanzadas (Abdelnour et al., 2022). Además, a medida que la enfermedad avanza, pueden aparecer complicaciones médicas como trastornos de la movilidad, desnutrición, infecciones respiratorias o trombosis, que afectan la calidad de vida y aumentan el riesgo de mortalidad (Zhang et al., 2024).

A nivel genético, el alzheimer puede clasificarse en dos tipos: formas esporádicas y familiares. La forma esporádica (SAD) es la más frecuente y se asocia a una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales, enfermedades previas y estilo de vida. Entre los factores genéticos implicados en SAD, destaca el gen *APOE*, cuyas variantes modulan el riesgo de desarrollar la enfermedad: *APOE*4 se asocia a un mayor riesgo, *APOE*3 se considera neutro y *APOE*2 podría ejercer un efecto protector. Además, se han identificado otros genes mediante estudios de asociación genómica, relacionados con la inflamación, la respuesta inmune, el colesterol y el metabolismo lipídico, y la endocitosis. En cambio, la forma familiar (FAD) es mucho menos común y se debe a mutaciones genéticas autosómicas dominantes en los genes *APP (amyloid precursor protein)*, *PSEN1 (presenilin 1)* o *PSEN2 (presenilin 2)*, todos implicados en el procesamiento del péptido A β . Esta variante suele manifestarse entre los 30 y los 65 años, progresa con mayor rapidez que la forma esporádica y se transmite entre generaciones (Zhang et al., 2024; Lane et al., 2018; Scheltens et al., 2016; Quiroz et al., 2024).

1.1.1. La mutación paisa (PSEN1 E280A)

Una de las formas mejor caracterizadas de FAD es la que se produce por la mutación autosómica dominante E280A en el gen *PSEN1*, también conocida como mutación paisa, identificada en una gran familia de la región de Antioquia (Colombia), compuesta por unos 6000 familiares consanguíneos, de los cuales más de 1000 son portadores de dicha mutación (Quiroz et al., 2024). Esta mutación consiste en un cambio de glutámico a alanina (E \rightarrow A) en el codón 280, lo que altera la función del complejo γ -secretasa, implicado en el procesamiento de APP, favoreciendo la producción de A β 42, siendo esta más propensa a formar placas amiloides. Además, se ha observado que este aumento de A β 42 afecta a la homeostasis del calcio, incrementando su almacenamiento en el retículo endoplasmático y facilitando su liberación hacia el citoplasma, lo que puede contribuir al daño celular (Acosta-Baena et al., 2011; Querfurth & LaFerla, 2010; Lalli et al., 2014).

El caso clínico de esta familia fue descrito por primera vez en 1987. Los síntomas suelen comenzar con pérdida de memoria, seguida de cambios en la personalidad, alteraciones en la conducta y un deterioro progresivo del lenguaje. En fases avanzadas, son frecuentes las dificultades al caminar, las convulsiones y las

mioclonías (Pastor et al., 2003). La edad media de aparición de los distintos estadios clínicos se ha estimado en 35 años para la fase asintomática pre-DCL (Deterioro Cognitivo Leve), 38 para la fase sintomática pre-DCL, 44 para DCL y 49 para el diagnóstico de demencia (Acosta-Baena et al, 2011). Por otro lado, el análisis genético de marcadores cercanos al gen *PSEN1* y el estudio de registros históricos han permitido rastrear la mutación hasta un ancestro común originario del norte de España en el siglo XVI. La familia colombiana forma parte de la población paisa, lo que ha dado nombre a esta variante como mutación paisa, una comunidad con características genéticas homogéneas y sin evidencia de mezcla significativa desde su fundación, lo que refuerza su valor como modelo para el estudio de las fases más tempranas de la enfermedad (Pastor et al., 2003; Lopera et al., 1994).

Es interesante remarcar que se ha observado que la presencia de ciertas variantes genéticas, como apoE3 Christchurch (*APOE3Ch*), pueden modificar la expresión clínica de la mutación *PSEN1*. En estudios recientes, individuos de la familia paisa, portadores tanto de la mutación E280A como de *APOE3Ch* presentaron un retraso en la aparición del deterioro cognitivo, lo que sugiere un posible efecto protector de estas variantes (Quiroz et al., 2024).

1.2. Vesículas extracelulares (VEs)

Las VEs son partículas de pequeño tamaño, delimitadas por una bicapa lipídica que no poseen capacidad replicativa propia y son liberadas activamente por diversos tipos celulares, tanto en organismos procariotas como eucariotas (Yáñez-Mó et al., 2015; Welsh et al., 2024). Están presentes en todos los fluidos corporales humanos, como sangre, orina, saliva, leche materna o líquido cefalorraquídeo, en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Su contenido incluye proteínas (como receptores de membrana, enzimas, factores de transcripción o componentes de la matriz extracelular), lípidos y ácidos nucleicos como ARN mensajero (ARNm), microARNs (miARNs) y ADN. Este contenido puede transferirse entre células, lo que les permite actuar como vehículos de señalización y comunicación intercelular (Chang et al., 2020; Kumar et al., 2024). Además, las VEs desempeñan funciones fisiológicas clave, participando en procesos como la homeostasis celular, la hemostasia, la respuesta inmunitaria, la inflamación, la regeneración tisular y la muerte celular programada (Yáñez-Mó et al., 2015).

En función de su biogénesis, las VEs se clasifican principalmente en exosomas y microvesículas (Figura 2). Los exosomas (50 – 150 nm) se forman en el interior de endosomas multivesiculares (MVEs), como vesículas intraluminales (ILVs), y se liberan al exterior tras la fusión de los MVEs con la membrana plasmática. Las microvesículas (50 – 500 nm) sin embargo se generan por la liberación directa de vesículas desde la membrana plasmática (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018; Mittelbrunn & Sánchez-Madrid, 2012). También pueden clasificarse según el tipo celular del que proceden, como por ejemplo, células endoteliales, plaquetas, adipocitos, entre otros, o según su estado fisiológico (Akbar et al., 2019).



Figura 2. Esquema simplificado de la biogénesis de exosomas y microvesículas. Los exosomas (*Exosome*) se forman como vesículas intraluminales (ILVs) dentro de endosomas multivesiculares (MVEs), y se liberan al medio extracelular tras la fusión de estos con la membrana plasmática (*Plasma membrane*). Por otro lado, las microvesículas (*Microvesicle*) se generan por la liberación directa desde la membrana celular. *Imagen de van Niel, D'Angelo & Raposo, 2018*.

1.2.1. Implicación de las VEs en la enfermedad de Alzheimer

Se ha observado que las VEs desempeñan un papel en distintas patologías humanas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, metabólicas como diabetes, inmunológicas, infecciosas, inflamatorias, oncológicas y neurodegenerativas (Kumar et al., 2024). Entre las enfermedades neurodegenerativas, se ha demostrado que las VEs pueden contribuir a la propagación de proteínas mal plegadas, como la A β , la proteína tau hiperfosforilada, la α -sinucleína o la superóxido dismutasa, facilitando la propagación entre células y promoviendo la progresión de patologías como el alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (Xiao et al., 2021).

En concreto, en la enfermedad de Alzheimer se ha descrito que las VEs desempeñan funciones distintas según el estadio de la enfermedad. Durante las fases iniciales, la activación de la microglía inducida por A β parece tener un papel protector, al favorecer la fagocitosis y la eliminación de estos agregados. Sin embargo, en fases más avanzadas, esta misma microglía puede liberar VEs con un contenido perjudicial, entre el que se incluyen moléculas proinflamatorias, que contribuyen a intensificar la inflamación y el daño neuronal. También se ha observado que estas VEs pueden llevar, tal y como se ha comentado anteriormente, proteínas asociadas a procesos neurodegenerativos, como A β , tau o α -sinucleína, que al ser transferidas a otras células podrían favorecer la acumulación de estas mismas proteínas en las células receptoras. Además, algunos tipos de VEs son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permitiría que su contenido se disemine a otras regiones del sistema nervioso y amplifique el deterioro neurológico (Song et al., 2020).

En los últimos años, el creciente interés por las VEs en el contexto del alzheimer no solo se ha centrado en su papel en la progresión de la enfermedad, sino también en su potencial como herramienta diagnóstica. A diferencia de otras moléculas presentes en sangre, las VEs presentan ventajas como su estabilidad, relativa abundancia y capacidad para reflejar alteraciones relacionadas con distintos procesos patológicos. Dado que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y transportar una amplia variedad de componentes celulares característicos del estado de sus células de origen, se considera que su análisis en fluidos periféricos, como el plasma, puede aportar información relevante sobre alteraciones moleculares que tienen lugar en el cerebro. Gracias a estas propiedades, las VEs han despertado interés como fuente de biomarcadores para la detección temprana y la caracterización de enfermedades neurodegenerativas. Además, su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica ha llevado a plantear su posible uso como vehículos terapéuticos en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso. No obstante, deben tenerse en cuenta ciertas limitaciones, como la variabilidad en los métodos de aislamiento y caracterización, que puede condicionar qué subtipos de VEs se aíslan en cada estudio. Además, la ausencia de un marcador único que identifique de forma específica a todas las VEs, hace necesario combinar distintas técnicas para caracterizarlas correctamente. A pesar de estas limitaciones, se ha observado que tanto la cantidad como el contenido proteico de estas vesículas puede verse alterado en distintos estados de enfermedad, posicionándolas como una herramienta prometedora para la detección temprana, el seguimiento de la progresión y la caracterización de enfermedades neurodegenerativas (Yáñez-Mó et al., 2015; Robinson et al., 2024; Song et al., 2020).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio de la Dra. Rocío Pérez se ha demostrado la relevancia de las VEs en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, ya que estas estructuras son capaces de transportar metabolitos de APP (Pérez-González et al., 2020; Perez-Gonzalez et al., 2012). Además, han evidenciado el potencial de las VEs de plasma como fuente de biomarcadores en enfermedades neurodegenerativas, como el síndrome de Down (Valle-Tamayo et al., 2025) y la enfermedad de Huntington (Herrero-Lorenzo et al., 2024). Por otro lado, si bien el grupo de investigación de la Dra. Inmaculada Cuchillo aún no ha publicado estudios específicos sobre VEs, cuenta con un amplia experiencia en el análisis de distintos tejidos humanos relacionados con enfermedades neurológicas, como corteza cerebral (Escamilla et al., 2024), líquido cefalorraquídeo (Lennol et al., 2022) y plasma (Cuchillo-Ibáñez et al., 2020).

Además, estudios realizados por investigadores de la Universidad de Antioquia, han mostrado que las VEs podrían desempeñar un papel relevante en la enfermedad de Alzheimer, tanto como mediadores del daño celular como potenciales biomarcadores. En particular, en pacientes con FAD, se observó que en el plasma, predominaban las VEs de origen plaquetario y éstas mostraban una composición proteica alterada. Esta composición incluía proteínas implicadas en procesos clave como la coagulación, la inflamación, la cascada del complemento y el metabolismo lipídico-glucídico, lo que podría contribuir a la disfunción endotelial, la activación astrocitaria y la neurotoxicidad (Villar-Vesga et al., 2020).

Este trabajo tiene como objetivo general realizar un estudio proteómico de las VEs circulantes en plasma de tres grupos definidos: controles no portadores, sanos asintomáticos portadores de la mutación paisa (*PSEN1* E280A), y pacientes portadores de la mutación con deterioro cognitivo leve. Para ello, se han aplicado distintas metodologías experimentales orientadas al aislamiento, validación y análisis proteómico de las VEs, con el fin de explorar posibles diferencias entre los tres grupos.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Aislar y concentrar VEs a partir de plasma humano utilizando cromatografía de exclusión por tamaño y ultrafiltración.
- Validar la presencia de VEs en las muestras tras su aislamiento en plasma, mediante *Western Blot* y cuantificar su contenido proteico mediante espectrofotometría (NanoDrop).
- Analizar el perfil proteico de las VEs mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) y comparar los resultados entre grupos, estudiando las rutas biológicas, componentes celulares y asociaciones genenfermedad mediante análisis bioinformático.
- Seleccionar y validar experimentalmente proteínas de las VEs candidatas a ser de interés en el contexto del alzheimer.
- Evaluar la localización intra o extravesicular de la apolipoproteína apoE, mediante tratamiento con proteinasa K.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras biológicas

Las muestras de plasma utilizadas en este estudio proceden de una colaboración con investigadores de la Universidad de Antioquia. El plasma fue obtenido mediante extracción sanguínea utilizando tubos con EDTA como anticoagulante, con el objetivo de minimizar la presencia de vesículas derivadas de plaquetas (Nieuwland & Siljander, 2024). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C tras su recogida y enviadas congeladas al laboratorio en Alicante, donde se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Se trabajó con un total de 40 individuos, distribuidos en tres grupos:

- Controles sin mutación ni síntomas (n = 10)
- Sanos asintomáticos portadores de la mutación PSEN1 E280A (n = 20)
- Pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) portadores de la mutación (n = 10).

Los volúmenes de plasma disponibles para cada individuo oscilaron entre 1,5 y 2 mL, y en algunos casos se contaba con más de un vial por sujeto (hasta 2–3 viales), lo cual permitió disponer de mayor volumen para las distintas etapas del experimento. A cada muestra se le asignó un identificador numérico del 1 al 40, para mantener el anonimato de las muestras, que fue utilizado a lo largo del procesamiento experimental.

3.2. Composición y preparación de disoluciones experimentales

3.2.1. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

- Hidróxido de sodio 0,5 M (NaOH) (500 mL): Se pesaron 10 g de NaOH sólido y se disolvieron lentamente en 300 mL de agua destilada (H₂Odd). Una vez completamente disuelto, se ajustó el volumen final a 500 mL con H₂Odd.
- Azida sódica (Na-Az) al 0,05 % (p/v) en PBS 1X (200 mL): Se pesaron 0,1 g de Na-Az y se disolvieron en 100 mL de PBS 1X. Tras su completa disolución, se ajustó el volumen final a 200 mL con PBS 1X.
- Tampón fosfato-salino 1X (PBS; Phosphate buffered saline) (1L): Se midieron 100 mL de PBS 10X y se diluyeron hasta 1000 mL con H₂Odd.

3.2.2. Western Blot (WB)

A continuación, se presentan las disoluciones utilizadas para los procedimientos de WB realizados para la validación de la presencia de VEs y apoE:

- **Tampón RIPA 2X:** Se suplementó con una proporción 1/50 de inhibidores de proteasas y fosfatasas *"Half Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail"* (100x) y EDTA 0,5 M (100x).
- Tampón de electroforesis 1X Tris/Glicina/SDS (2L): Se diluyeron 200 mL del stock 10X de Biorad en 1800 mL de H₂Odd para obtener 2 litros de solución final 1X.

- Tampón de transferencia para el sistema Trans-Blot Turbo (500 mL): Para la transferencia semiseca rápida, se mezclaron 100 mL del stock Trans-Blot 5X con 100 mL de etanol y 300 mL de H₂Odd, hasta alcanzar un volumen final de 500 mL.
- Tampón de marcado sin tinción 1X (No Stain Labeling Buffer) (10mL): Se preparó a partir del stock concentrado (20X), añadiendo 0,5 mL de este a 9,5 mL de H₂Odd, para obtener un volumen final de 10mL por membrana.
- Tampón tris-salino 1X (TBS; Tris Buffered Saline) (500 mL): Se preparó a partir de 50 mL de TBS 10× en 450 mL de H₂Odd, obteniendo un volumen total de 500 mL.
- Tampón tris-salino Tween 1X (TBS-Tween) (500 mL): Se mezclaron 50 mL de TBS 10X con 450 mL de H₂Odd y se añadieron 500 μL de Tween, homogeneizando la mezcla mediante agitación.
- Tampón de carga 6X (SB 6X; Sample Buffer 6X): Se utilizó el tampón comercial "Laemmli SDS sample buffer 6x" en condiciones reductoras o no reductoras

En el procedimiento de WB de apoE con tratamiento de proteinasa K, se utilizaron las disoluciones que se detallan a continuación:

- Proteinasa K: A partir de una concentración de 20 mg/mL se diluyó en una proporción 1:100 en la preparación de VEs en PBS 1X hasta 0,2 mg/mL
- Inhibidor de proteasa 0,1M (PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride): Se utilizó a partir del stock 100 mM preparado en etanol puro.
- Tampón de electroforesis (2L): Se utilizaron 400 mL de stock Tris-Glicina 5X, 20 mL de SDS 10% y 1580 mL de H2Odd. Para preparar la solución stock de Tris-Glicina 5X, se mezclaron 30,29 g de Tris base (125 mM) y 144,13 g de glicina (960 mM). El pH resultante fue aproximadamente 8,3.
- Tampón de transferencia (1L): Se utilizaron 100 mL de metanol, 200 mL de Tris-Glicina, 1 mL de SDS 10% y el volumen restante de H2Odd.
- Tampón de carga 6X (SB 6X; Sample Buffer 6X): Se utilizó el tampón comercial "Laemmli SDS sample buffer 6x" en condiciones reductoras
- Tampón fosfato-salino 1X (PBS; Phosphate Buffered Saline) (1L): Primero se preparó PBS 10X con 14,8 g de Na₂HPO₄ anhidro, 72,2 g de NaCl y 4,3 g de KH₂PO₄, con un pH entre 7,3 y 7,4. Para obtener 1L de PBS 1X, se añadió 100 mL de PBS 10X a 900 mL de H2Odd.
- Tampón fosfato-salino Tween 1X (PBS-Tween) (1L): Se preparó añadiendo 0,5 mL de Tween 20 a 1L de PBS 1X.
- **Gel separador 10% (10mL):** Se utilizaron 2,5 mL de Tris-Base 1,5M, 100 μL de SDS 10%, 3,34 mL de acrilamida 30%, 4 mL de H2Odd, 50 μL de APS 10% y 12 μL de TEMED.
- Gel concentrador 10% (4mL): Se utilizaron 1 mL de *Buffer Upper 4X*, 0,4 mL de Acrilamida 30%, 2,6 mL de H2Odd, 20 μL de APS 10% y 5 μL de TEMED.

3.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

La preparación de las disoluciones se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *Human Apolipoprotein C3 ELISA Kit* (EHAPOC3, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). A continuación, se detallan los pasos seguidos para cada uno de los componentes:

- Diluyente del ensayo (1X): se preparó mediante una dilución 1:5 del concentrado original (Assay Diluyent 2 (5X)) con H₂Odd.
- Tampón de lavado (1X): se obtuvo diluyendo 20 mL del tampón de lavado concentrado (Wash Buffer Concentrate (20X)) en 380 mL de H₂Odd.
- Conjugado de biotina: el vial de conjugado de biotina (*Human Apolipoprotein C3 Biotin Conjugate*) se centrifugó brevemente y, a continuación, se añadieron 100 μL de diluyente del ensayo (1X) para preparar el concentrado de conjugado de biotina. Antes de su uso en el ELISA, esta disolución se diluyó en una proporción 1:80 con el mismo diluyente.
- Estreptavidina-HRP: el vial de estreptavidina-HRP (*Streptavidin-HRP (2000X)*) se centrifugó brevemente antes de su uso y se preparó la dilución en el diluyente del ensayo (1X) en una proporción 1:2000.
- Diluciones estándar: el vial de estándar liofilizado (*Human Apolipoprotein C3 Standard, recombinant human apolipoprotein C3*) se centrifugó brevemente y se añadieron 400 µL del diluyente del ensayo (1X) para preparar la disolución estándar de 200 ng/mL, mezclándola suavemente. A continuación, para preparar la solución inicial estándar de 10.000 pg/mL, se mezclaron 25 µL de la disolución estándar con 475 µL del diluyente del ensayo (1X). A partir de esta solución inicial, se realizaron diluciones en serie 1:4, en siete tubos consecutivos. Para cada dilución, se añadieron primero 300 µL de diluyente del ensayo (1X) en cada tubo. A continuación, se añadieron 100 µL de la dilución anterior al siguiente tubo, mezclando bien cada vez. Las concentraciones finales de la curva estándar fueron las siguientes: 10.000 pg/mL, 2.500 pg/mL, 625 pg/mL, 156,3 pg/mL, 39,06 pg/mL, 9,77 pg/mL y 2,44 pg/mL. Además, se incluyó un blanco (0 pg/mL), compuesto únicamente por diluyente del ensayo (1X).

Además de las disoluciones y reactivos descritos anteriormente, también se utilizó un tampón de lisis comercial M-PER *Mammalian Protein Extraction Reagent* (ThermoFisher Scientific) para la lisis de las muestras.

3.3. Aislamiento de VEs mediante SEC

Los viales de plasma fueron descongelados en hielo y revisados visualmente para registrar su color, transparencia y detectar posibles signos de hemólisis. También se tuvo en cuenta si el plasma presentaba un aspecto más opaco o blanquecino, ya que esto podía indicar un elevado contenido lipídico. A continuación, se anotó el volumen total disponible de plasma por individuo. A partir de cada muestra se recogieron 550 μL de plasma, con el objetivo de obtener 500 μL finales tras los pasos de centrifugación, volumen necesario para la carga en la columna.

El plasma fue procesado mediante dos pasos secuenciales de centrifugación, ambos realizados a 4 °C. En primer lugar, se centrifugó a 2.000 g durante 30 minutos, con el objetivo de eliminar posibles restos celulares, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos, lo que permitió obtener un sobrenadante, libre de cuerpos apoptóticos y VEs de gran tamaño, que fue utilizado para la SEC. El pellet resultante de esta segunda centrifugación (p12k) fue conservado para su análisis posterior. Para ello, se realizó un paso de lavado añadiendo 1 mL de PBS, seguido de una nueva centrifugación a 12.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet lavado se almacenó a –80 °C para futuros estudios.

Una vez procesada la muestra, se procedió al aislamiento de VEs mediante SEC, utilizando columnas qEVoriginal 70 nm Gen 2 (IZON) conectadas a un sistema automático de fraccionamiento (*Automatic Fraction Collector*, AFC). Para ello, tanto la columna como el tampón PBS se equilibraron previamente a temperatura ambiente, entre 18 y 24 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se retiró el tapón superior y se acopló la columna al AFC, que reconoció automáticamente su código QR.

Posteriormente, se calibró el sistema mediante la alineación del carrusel con la boquilla de salida del fluido y ajustando la escala mediante un peso de referencia de 10 gramos. Tras este paso, se activó la opción *"Start Collection"* y se colocaron los tubos de recogida, en este caso un total de 13 tubos Eppendorf. Una vez completada esta preparación, se retiró el tapón inferior y se lavó la columna con 17 mL de PBS, equivalentes a dos volúmenes de columna, para eliminar el tampón de almacenamiento (PBS con azida sódica al 0,05%) y dejar la columna lista para la separación.

Tras lavar la columna, se cargaron los 500 µL de muestra lentamente sobre la columna, procurando evitar la formación de burbujas. Tras la entrada completa de la muestra, se añadieron aproximadamente 7 mL de PBS como tampón de elución. El sistema AFC realizó la recolección automática de 13 fracciones consecutivas de 400 µL, que fueron depositadas en los tubos Eppendorf de 1,5 mL previamente etiquetados. Una vez finalizada la recogida de fracciones, las columnas se lavaron con 8,5 mL de NaOH 0,5 M, seguidos de 17 mL de PBS si se iba a reutilizar de forma consecutiva. En caso de no usarse inmediatamente, el lavado final se realizó con 17 mL de PBS con azida sódica al 0,05%, conservándose posteriormente en esta solución hasta su siguiente uso.

Antes de su utilización, todas las soluciones líquidas empleadas en el proceso, incluyendo PBS, NaOH 0,5 M y PBS con azida sódica al 0,05%, fueron filtradas mediante un filtro de 0,22 µm para asegurar la eliminación de partículas, garantizar su esterilidad y prevenir cualquier posible contaminación. El procedimiento seguido para el aislamiento mediante SEC se basó en las recomendaciones del fabricante (qEVoriginal Gen 2 Quick Start Guide, IZON Science). Esta técnica ha sido reconocida como una opción

preferente para el aislamiento de VEs a partir de muestras de plasma, al proporcionar un equilibrio adecuado entre rendimiento, pureza y una representación vesicular comparable a la del plasma sin procesar (Robinson et al., 2024).

3.4. Cuantificación de proteínas mediante espectrofotometría (NanoDrop)

Tras la recolección de las fracciones, se midió la absorbancia a 280 nm (A280) de cada una de ellas mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop. Esta medición se empleó para estimar el contenido proteico total e identificar el pico correspondiente a las fracciones enriquecidas en VEs. Las mediciones se realizaron utilizando 2 µL de muestra y PBS como blanco.

Para la comparación entre grupos en los datos experimentales de cuantificación proteica (NanoDrop), se aplicó la prueba t de Student para la obtención de los valores de p (p-value). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con p < 0.05.

3.5. Combinación y concentración de fracciones enriquecidas en VEs

Se combinaron las fracciones 1-4, correspondientes al intervalo de fracciones en el que se se encuentran la mayoría de VEs, alcanzando un volumen inicial de 1.600 μ L. Las fracciones combinadas se concentraron usando las columnas Amicon Ultra-4 (membrane PLHK Ultracel-PL, Merck) de 100 kDa, mediante centrifugación a temperatura ambiente en un rotor fijo a 5.000 g, durante un tiempo variable en función de la muestra (3 - 5 minutos), hasta alcanzar un volumen final aproximado de entre 200 - 400 μ L.

Del volumen concentrado obtenido tras la combinación de fracciones, se separaron tres alícuotas correspondientes al 10% del volumen final para WB, NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), y reserva (*Back Up* o BU) para posibles validaciones posteriores. El volumen restante, un 70% del volumen final, se destinó al análisis proteómico.

3.6. Validación de marcadores de VEs mediante WB

Para validar la presencia de VEs en las muestras obtenidas, se realizaron WB dirigidos frente a los marcadores clásicos de membrana de VEs, las tetraspaninas CD63 y CD9 (Yáñez-Mó et al.). Las 40 muestras disponibles se dividieron en tres WBs. A partir de la alícuota reservada para WB, se prepararon dos condiciones: condiciones no reductoras para CD63 (sin β-mercaptoetanol) y condiciones reductoras para CD9.

Para las muestras en condiciones no reductoras, se utilizó un tercio del volumen, al que se añadió SB 6x (una quinta parte del volumen total). Por otra parte, en condiciones reductoras, se emplearon los dos tercios restantes del volumen, a los cuales se añadió un volumen equivalente de tampón de lisis RIPA, previamente suplementado con *Half Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail* (100x) y EDTA 0,5 M (100x). Las muestras en RIPA se sometieron a sonicación en baño frío durante 45 segundos y se agitaron en vortex

brevemente cada 2 minutos durante 20 minutos para favorecer la lisis. Tras este paso, se añadió tampón de carga SB 6x (una quinta parte del volumen total: vesículas + RIPA).

Antes de la carga en el gel, las muestras bajo condiciones reductoras se calentaron en un termobloque a 90 °C durante 10 minutos, seguidos de una agitación en vortex y una breve centrifugación. En estas condiciones, se cargó únicamente la mitad del volumen final preparado. En condiciones no reductoras, se cargó todo el volumen previamente mezclado con tampón de carga SB 6x.

En todos los casos, se utilizó un kit comercial para preparación de geles precast TGX, al 10% (Bio-Rad, *No Stain Free*) con sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo con voltajes progresivos (80 V inicialmente y 200 V posteriormente), con ligeras variaciones en los tiempos entre sets. La transferencia semi-seca se realizó mediante el sistema Trans-Blot Turbo (2.5 Amp, 25 V, 10 minutos) sobre membranas PVDF de poro 0,45 µm (Bio-Rad, *Low Fluorescence*).

Tras la transferencia, las membranas se prepararon para la visualización de la proteína total mediante el reactivo *No-Stain* (ThermoFisher Scientific). Para ello, se lavaron dos veces con agua miliQ durante 2 minutos en agitación. Posteriormente, se preparó el *Labeling Buffer* añadiendo 20 µL de *No-Stain Activator* y 20 µL de *No-Stain Derivatizer* a 10 mL del *No Stain Labeling Buffer*, mezclando bien antes de aplicarlo a la membrana. La membrana se incubó con esta mezcla durante 10 minutos en agitación. Finalmente, se realizaron tres lavados adicionales con agua miliQ durante 2 minutos cada uno, también en agitación y se visualizaron en el sistema ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

A continuación, las membranas se bloquearon con 7 mL de la solución comercial EveryBlot (Bio-Rad) durante 5 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron *overnight* a 4 °C en agitación, utilizando diluciones de 1:1000 en 7 mL de EveryBlot. Se utilizó anti-CD63 (mouse monoclonal, Biotechne) en condiciones no reductoras y anti-CD9 (rabbit policional, Cell Signaling) en condiciones reductoras. Tras la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween en agitación y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-mouse HRP (1:15.000) para CD63 y anti-rabbit HRP (1:10.000) para CD9, preparados en leche al 5% en TBS-Tween.

Posteriormente, se realizaron los lavados finales: en el caso de anti-mouse HRP (CD63) se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween seguidos de dos lavados de 10 minutos con TBS. Para anti-rabbit HRP (CD9) se llevaron a cabo tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween antes del revelado seguido de dos lavados de 10 minutos con TBS.

El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia, utilizando un sustrato comercial adecuado (ECL, PICO, FEMTO o ATTO; ThermoFhiser Scientific) según la sensibilidad requerida. Se aplicaron 1,4 mL de la solución de revelado por membrana, distribuyéndola sobre toda la superficie y dejando actuar la reacción durante 5 minutos en oscuridad. Finalmente, las membranas se visualizaron en el sistema ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.7. Análisis proteómico

3.7.1. Preparación de muestras y adquisición de datos mediante espectrometría de masas

El estudio proteómico fue realizado en la Unidad de Proteómica del CIC Biogune. Las fracciones combinadas y concentradas fueron tratadas con un tampón de lisis que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% y DTT 200 mM, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas presentes.

La digestión proteica con tripsina se llevó a cabo mediante el método FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*) (Wisniewski et al., 2009). Los péptidos generados fueron concentrados mediante fase reversa utilizando columnas OMIX C18 (Agilent Technologies). Estos fueron analizados mediante cromatografía líquida a nanoescala, acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS), utilizando el sistema EVOSEP acoplado a un espectrómetro TIMS TOF Pro (Bruker).

La adquisición de datos se realizó mediante el enfoque DIA (Data Independent Acquisition). Los datos obtenidos fueron procesados con el software DIA-NN (v1.8) y el análisis estadístico posterior se llevó a cabo utilizando el programa Perseus, del entorno MaxQuant.

3.7.2. Análisis bioinformático de datos proteómicos

Los resultados del análisis proteómico fueron entregados por parte de CIC Biogune en un archivo Excel. De este archivo se utilizaron los siguientes datos para los análisis posteriores: nombre de la proteína, gen asociado, niveles de expresión de cada proteína por muestra y comparaciones entre grupos experimentales (valores de *p*-value y Fold Change (FC)).

A partir de esta información, y antes de iniciar el análisis funcional, se reorganizaron los datos para obtener las proteínas detectadas en al menos una muestra de cada grupo. Con estas listas se generó un diagrama de Venn mediante la herramienta Venny 2.1, con el objetivo de visualizar las proteínas exclusivas y las compartidas entre los grupos.

Posteriormente, se representaron *volcano plots* para las tres comparaciones por pares (sanos vs controles, sanos vs DCL y DCL vs controles), empleando la herramienta en línea VolcaNoseR. En estos gráficos se representaron los valores de $\log_2(FC)$ y $-\log_{10}(p-value)$ para cada proteína, de modo que se pudieran visualizar las diferencias de expresión de manera simétrica y clara, aplicando un umbral de \log_2FC de ±0,8 y de $-\log_{10}(p-value)$ de 1,3 (correspondiente a un *p-value* < 0.05). El *Fold Change* (FC) es la razón entre la expresión de una proteína en una condición respecto a otra. Si FC es 2, significa que la expresión de la proteína de interés se ha duplicado en un grupo respecto al grupo con el que se compara. El logaritmo en base 2 del FC se utiliza para facilitar la interpretación de los datos. Un FC de 2, corresponde a un $\log_2(FC)$ de 1. Un FC de 0,5 (reducción de la expresión a la mitad), corresponde a un $\log_2(FC)$ de -1. Respecto al *p-value*, cuanto más pequeño el *p-value*, más significativa es la diferencia. Al realizar el $-\log_{10}(p-value)$, los valores pequeños (más significativos) se vuelven valores grandes positivos. Así, *p* = 0,05 se convierte en 1,3, y *p* =0,01, en 2, al representarlos como el $-\log_{10}(p-value)$

Tras esta exploración inicial, se llevó a cabo un análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas utilizando principalmente la herramienta en línea STRING, para explorar redes de interacción funcional, rutas biológicas implicadas, componentes celulares y asociaciones gen-enfermedad. Como herramienta complementaria se empleó también Metascape, con el fin de comparar los resultados obtenidos en STRING.

Finalmente, se consultaron distintas bases de datos bioinformáticas como Open Targets, DisGeNET, y GeneAnalyst, con el objetivo de identificar proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer y se recopilaron scores que reflejan el nivel de evidencia experimental, genómica y bibliográfica que vincula cada gen con la enfermedad. Esta información se revisó junto con los valores de cambio de expresión (FC) y sus respectivos valores de *p* (*p*-value), permitiendo así seleccionar aquellas proteínas que presentaban mayor relevancia bibliográfica, experimental, cambio de expresión y significancia estadística, para ser validadas experimentalmente.

3.8. Validación experimental de proteínas de interés

3.8.1. Análisis de apoC3

La validación de apoC3 se llevó a cabo mediante un ensayo ELISA tipo sándwich, empleando el kit comercial *Human Apolipoprotein C3 ELISA Kit* (EHAPOC3, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Antes de comenzar, se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente y se mezclaron suavemente para asegurar su correcta homogeneización. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras y los estándares fueron distribuidos en un placa de 96 pocillos, realizando duplicados para cada estándar y muestra analizados. Las dos primeras columnas de la placa se reservaron para la curva estándar (de 10.000 a 2,44 pg/mL) y el blanco. Las columnas restantes se emplearon para el análisis de las muestras. Para ello, se utilizó la alícuota de reserva *Back Up* (BU), que contenía el 10 % de las fracciones de VEs concentradas. A cada muestra se le añadió el doble de su volumen de tampón de lisis M-PER, y posteriormente se completó con el diluyente del ensayo (1X) hasta alcanzar un volumen final de 220 μ L por muestra. A continuación, se añadieron 100 μ L de cada muestra o estándar en los pocillos correspondientes. La placa se cubrió y se incubó durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Finalizada esta incubación, se realizaron cuatro lavados con tampón de lavado 1X.

Posteriormente, se añadieron 100 μ L del conjugado de biotina y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Tras este paso, se repitieron los lavados. A continuación, se añadieron 100 μ L de la solución de estreptavidina-HRP, se incubó la placa durante 45 minutos a temperatura ambiente, también con agitación suave, repitiendo nuevamente los lavados al finalizar. Seguidamente, se añadieron 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo, incubando la placa durante 30 minutos a temperatura

ambiente en la oscuridad. Finalmente, se añadieron 50 μL de solución de parada, mezclando hasta observar el cambio de color de azul a amarillo.

La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm y, a partir de los valores obtenidos, se generó una curva estándar mediante un modelo de cuatro parámetros, utilizando las concentraciones conocidas de los estándares. Las concentraciones absolutas de apoC3 de las muestras se determinaron interpolando sus valores de absorbancia en dicha curva. Los valores de apoC3 se normalizaron utilizando la señal de intensidad de proteína total *No Stain* de las membranas utilizadas para WB. Dado que los datos seguían una distribución normal, se aplicó un test paramétrico ANOVA para identificar posibles diferencias entre los grupos.

3.8.2. Análisis de apoE

La validación de apoE se realizó mediante WB utilizando el mismo protocolo experimental empleado en la detección de los marcadores vesiculares, bajo condiciones reductoras en el mismo gel que CD9. Se utilizó el anticuerpo primario anti-apoE (goat policional, Millipore), diluido 1:2000 en 7 mL de EveryBlot (Bio-Rad), y posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario anti-goat HRP (1:7000) preparado en leche al 5% en TBS-Tween. Los lavados finales consistieron en tres lavados de 10 minutos en TBS-Tween, seguidos de dos lavados de 10 minutos con TBS, tras los cuales se llevó a cabo la visualización de las bandas correspondientes a apoE mediante el sistema ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ, donde se midió la intensidad de cada banda obtenida. Posteriormente, los valores de intensidad se normalizaron utilizando la señal del *No-Stain* como control de carga, al igual que con apoC3, lo que permitió corregir posibles variaciones en la cantidad de proteína cargada entre las muestras. Considerando que los datos presentaron una distribución normal, se empleó un análisis estadístico de tipo paramétrico (ANOVA) con el fin de detectar diferencias significativas entre los grupos evaluados.

3.9. Localización intra o extravesicular de apoE mediante tratamiento con proteinasa K

Con el objetivo de determinar si la proteína apoE se encontraba en el interior de las VEs o asociada a su superficie, se realizó un experimento empleando muestras de plasma de sujetos control externas al estudio principal. Se tomaron dos alícuotas de plasma que fueron procesadas mediante SEC, siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.3. Las fracciones 1 a 3, correspondientes a las VEs, fueron seleccionadas y cuantificadas por espectrofotometría (NanoDrop). Posteriormente, se concentraron por ultracentrifugación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para ello, los volúmenes correspondientes a las fracciones seleccionadas (hasta completar 1200 uL por muestra) fueron transferidos a tubos de 4 ml de ultracentrífuga. El volumen total se ajustó a 2 mL con PBS estéril, pesando cada tubo por una balanza de precisión para ajustar el volumen de las muestras contrapeso. Las muestras se ultracentrifugaron durante 1 hora y 10 minutos a 36.000 rpm correspondiente a 100.000 g en un rotor 70Ti (Beckman Coulter). Tras este proceso, se retiraron 100 µL del sobrenadante y se decantó el resto, asegurándose de secar las paredes del tubo para eliminar restos de líquido. El pellet obtenido fue resuspendido con 50 µL de PBS dos veces consecutivas, hasta alcanzar un volumen final de 100 µL por muestra. Ambas muestras fueron posteriormente combinadas para un volumen total de 200 µL.

Este volumen se dividió inicialmente en tres alícuotas de 66 μ L, correspondientes a las condiciones sin tratamiento (NT), tratamiento con proteinasa K (PK) y una tercera condición con Triton X-100. Sin embargo, esta última fue descartada por error experimental y no se utilizó en los análisis posteriores. Para la condición NT se añadieron 66 μ L de VEs y 34 μ L de PBS. Para la condición con PK, se añadieron 66 μ L de VEs, 10 μ L de PK y 24 μ L de PBS. Ambas muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 μ L de PMSF 100 mM para inactivar la enzima (Gilboa et al., 2024). Finalmente, las muestras se agitaron a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora y, finalizado el tratamiento, las muestras fueron procesadas para su análisis mediante WB.

Para el WB, se cargaron 20 μ L de muestra para las fracciones 1-3 y el sobrenadante, y 30 μ L para las muestras tratadas (PK+ y PK–). A cada volumen se añadió el tampón de carga SB 6x: 4 μ L en el caso de las muestras de 20 μ L y 5 μ L para las muestras de 30 μ L. Posteriormente, todas las muestras fueron calentadas para su desnaturalización a 98 °C durante 5 minutos.

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en un gel al 10% utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) y aplicando 120 V. Tras la separación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de poro 0,45 µm mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, utilizando tampón de transferencia. La transferencia se realizó a 110 V durante 50 minutos a 4 °C, en la cámara fría.

Una vez completada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con 5 mL de una disolución de bloqueo (*Blocking buffer*, Bonsay, Licor), con el objetivo de evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-apoE (Millipore), diluyendo 1 μ L de anticuerpo en 5 mL de la misma disolución + tween *overnight* a 4 °C en agitación.

Tras la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween en agitación. Luego, se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, preparado con 0,5 μ L en 5 mL de disolución de bloqueo + tween. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBS-Tween y dos lavados adicionales de 10 minutos con PBS.

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante escaneo por fluorescencia utilizando el sistema Odyssey CLx (LI-COR), detectando las señales en el canal de fluorescencia roja (~670 nm).

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de VEs mediante SEC

Se analizaron muestras de plasma de 40 individuos, distribuidos en tres grupos: controles (n=10), sanos asintomáticos portadores de la mutación *PSEN1* E280A (n=20) y pacientes con DCL (n=10). De cada muestra se procesaron 500 μ L de plasma para el aislamiento de VEs mediante SEC, obteniéndose 13 fracciones por muestra. En este tipo de separación, las proteínas de mayor tamaño eluyen en las primeras fracciones, mientras que las más pequeñas lo hacen en las últimas. El procedimiento completo se detalla en el aparado 3.3 de "Materiales y métodos".

4.2. Cuantificación proteica de fracciones por espectrofotometría (NanoDrop)

Se midió la absorbancia a 280 nm en cada una de las 13 fracciones obtenidas, con el objetivo de estimar el contenido proteico y comparar los perfiles entre los tres grupos de estudio. Esta evaluación también permitió identificar el pico de proteínas asociado a las VEs, en las fracciones 2 o 3, lo que sirvió como una validación inicial del aislamiento.



Perfil los Figura 3. de absorbancia por fracción en tres grupos analizados. Fracciones 1–6 (A). Fracciones 7–13 (B). En ambos gráficos se representan los valores medios de absorbancia (eje Y, en mg/mL) en función del número de fracción (eje X). Los asteriscos verdes indican diferencias significativas entre controles y DCL, mientras que los asteriscos negros indican diferencias entre DCL y los grupos control y sano (p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***) t de Student). No se incluyen las barras de error estándar para facilitar la visualización del perfil de absorbancia entre grupos.

En las fracciones 1–6 (Figura 3A), al comparar controles y DCL, se encontraron diferencias significativas en las fracciones 3, 4 y 5. En estas fracciones, la curva correspondiente al grupo control aparece desplazada hacia la derecha respecto a la de DCL y sanos. En las fracciones 7–13 (Figura 3B), correspondientes principalmente a proteínas solubles, se identificaron diferencias significativas entre DCL y los otros dos grupos. En particular, se detectó un aumento progresivo de la absorbancia en pacientes con DCL, con diferencias significativas en las fracciones 10 a 13.

Finalmente, la cuantificación del contenido proteico tras la combinación y concentración de las fracciones 1–4 permitió calcular la recuperación media de proteína por grupo. Los valores obtenidos fueron elevados en los tres casos: 63,30 % en sanos, 72,62 % en controles y 72,75 % en pacientes con DCL.

4.3. Validación de la presencia de VEs por WB

La presencia de VEs en las muestras fue evaluada mediante WB frente a los marcadores CD63 y CD9 (Figura 4). En el caso de CD63 (Figura 4A), se observaron bandas difusas (*smear*) en el rango de 30 a 60 kDa, centrado alrededor de los 45 kDa, lo cual es característico de esta proteína transmembrana altamente glicosilada. CD9 (Figura 4B) mostró bandas definidas en el rango esperado, entre 20-25 kDa (Kowal et al., 2017). En ambos casos, se observaron variaciones en la intensidad de las bandas entre muestras, aunque estas diferencias no fueron objeto de estudio en este trabajo.



Figura 4. Detección de marcadores de VEs por WB. Se muestran los resultados obtenidos para los marcadores CD63 (A) y CD9 (B). En la imagen (A) se representan las muestras del set 1 analizadas bajo condiciones no reductoras, mientras que en (B) se muestran las muestras del set 2 procesadas en condiciones reductoras. Las siglas corresponden a los tres grupos del estudio: sanos (S), controles (C) y pacientes con deterioro cognitivo leve (D). Los números a la izquierda indican el peso molecular en kilodaltons (kDa). En esta figura se muestran ejemplos representativos.

4.4. Análisis proteómico

4.4.1. Proteínas diferencialmente expresadas y distribución por grupos

A partir del análisis proteómico realizado mediante espectrometría de masas y posterior procesamiento estadístico, se identificaron un total de 502 proteínas en las VEs analizadas. De estas, se identificaron 36 proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y controles, 79 entre sanos y pacientes con DCL, y 30 entre DCL y controles.

En los volcano plots correspondientes a las comparaciones por pares (Figuras 5A–C), se observa que la comparación entre sanos y DCL (Figura 5B) muestra el mayor número de proteínas diferencialmente expresadas, con una distribución tanto de aumentos como de disminuciones. Cuanto mayor sea el valor en el eje X indicará mayor incremento en la expresión (si es positivo) o mayor reducción de expresión (si es

RESULTADOS

negativo) de cada proteína respecto al grupo con el que se compara. En este último caso, esto implica que esa proteína se expresa más en el segundo grupo. En el eje Y, a mayor valor, mayor significancia del cambio de expresión. Se aplicó como umbral p < 0.05 y un $\log_2(FC) \pm 0.8$ para distinguir proteínas con diferencia de expresión en un grupo respecto a otro. En menor medida, también se aprecian diferencias en la comparación entre sanos y controles (Figura 5A), mientras que la comparación entre DCL y controles (Figura 5C) presenta un número más reducido de proteínas con cambios significativos. Algunas proteínas aparecen destacadas por su marcada expresión diferencial, como CLEC10A, tubulina alfa 4A (TUBA4A) o la apolipoproteína C3 (apoC3), que se repiten en más de una comparación entre grupos. En cada gráfico se muestra el $\log_2(FC)$ en el eje X y el $-\log_{10}(p$ -value) en el eje Y.



Figura 5. *Volcano plots* de comparaciones entre grupos y diagrama de Venn de proteínas detectadas. Se representan los *volcano plots* correspondientes a las comparaciones por pares: sanos vs controles (A), sanos vs DCL (B) y DCL vs controles (C). Los puntos en rojo corresponden a proteínas con mayor expresión en el grupo situado en primer lugar en la comparación (por ejemplo, sanos en "Sanos vs DCL"), mientras que los puntos en azul indican proteínas con menor expresión en ese grupo, lo que implica una mayor expresión en el segundo. Las gráficas se generaron mediante la herramienta VolcaNoseR. (D) Diagrama de Venn generado con la herramienta Venny 2.1, en el que se representan las proteínas detectadas en cada grupo: sanos (azul), controles (amarillo) y DCL (verde) así como aquellas compartidas entre pares de grupos. Además, se generó un diagrama de Venn (Figura 5D) para visualizar la distribución de las proteínas detectadas entre los grupos. De las 502 proteínas totales, 492 fueron comunes a todos ellos. Se identificaron también algunas proteínas no compartidas por los tres grupos: tres fueron exclusivas del grupo sano, mientras que otras se encontraron únicamente compartidas entre sanos y controles (n = 3), y entre sanos y DCL (n = 4).

4.4.2. Análisis de rutas biológicas, compartimentos celulares y enfermedades asociadas

Con el objetivo de interpretar los resultados desde un punto de vista funcional, se utilizó principalmente la herramienta STRING, para analizar los procesos biológicos, las localizaciones celulares y las posibles asociaciones con enfermedades. También se utilizó Metascape para verificar los resultados. Aunque todos los resultados importantes se describen en el texto, no se han incluido todas las gráficas generadas, sino una selección de imágenes representativas para facilitar la comprensión.

• Análisis global de las proteínas identificadas

Antes de analizar las comparaciones por pares, se llevó a cabo un análisis funcional general con todas las proteínas identificadas en el análisis proteómico de las VEs.



Figura 6. Enriquecimiento de procesos biológicos (*Gene Ontology***) en el análisis global.** Se representan los términos más significativos obtenidos mediante la herramienta STRING. En el eje Y se indican los procesos biológicos enriquecidos, mientras que en el eje X se muestra la puntuación de enriquecimiento (*Signal*). El tamaño de los círculos representa el número de genes asociados a cada término y el color indica el nivel de significancia ajustado (FDR, *False Discovery Rate*), siendo más claro cuanto mayor es la significancia.

Entre los resultados más destacados (Figura 6) se encontraron rutas relacionadas con la activación del sistema del complemento, la respuesta inmune humoral y procesos como la coagulación sanguínea y la hemostasia. En cuanto a la localización celular, los términos enriquecidos incluían partículas de origen sanguíneo, lipoproteínas, exosomas, lumen vesicular, gránulos plaquetarios y matriz extracelular. En el análisis de enfermedades, los términos más significativos estuvieron asociados a trastornos de la coagulación, alteraciones del sistema hematopoyético y amiloidosis.

Comparación entre sanos y controles

En esta comparación, los procesos biológicos más significativos (Figura 7) estuvieron relacionados con el ensamblaje y el remodelado de partículas lipoproteicas, así como con el eflujo y transporte del colesterol. En la red de interacción proteína-proteína generada mediante STRING (Figura 8), se observa un clúster de proteínas directamente relacionado con estos procesos, (colores rojo, verde y azul respectivamente) formado por distintas apolipoproteínas. Además, esta agrupación aparece conectada a través de interacciones con proteínas relacionadas con el sistema inmune (color amarillo), lo que indica una posible relación funcional entre ambos conjuntos.



Figura 7. Enriquecimiento de procesos biológicos (*Gene Ontology***) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y control.** Se representan los términos más significativos obtenidos mediante la herramienta STRING. En el eje Y se indican los procesos biológicos enriquecidos, mientras que en el eje X se muestra la puntuación de enriquecimiento (*Signal***)**. El tamaño de los círculos representa el número de genes asociados a cada término y el color indica el nivel de significancia ajustado (FDR, *False Discovery Rate*), siendo más claro cuanto mayor es la significancia.



Figura 8. Red de interacción funcional de proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y controles. La red fue generada mediante la herramienta STRING. Cada nodo representa una proteína, y las conexiones indican interacciones. Los colores de los nodos corresponden a los procesos biológicos más significativos resaltados: rojo (*Plasma lipoprotein particle assembly*), azul (*Cholesterol efflux*), verde (*Plasma lipoprotein particle assembly*), azul (*Cholesterol efflux*), verde (*Plasma lipoprotein particle remodeling*) y amarillo (*Immune response*). Las proteínas sin color no se agrupan dentro de ninguno de estos términos. El color de las líneas representa el tipo de evidencia de interacción: azul claro (*from curated databases*), rosa (*experimentally determined*), verde oscuro (*gene neighborhood*), rojo (*gene fusions*), azul oscuro (*gene co-occurrence*), verde claro (*textmining*), negro (*co-expression*) y lila (*protein homology*).

Desde el punto de vista de la localización celular, las proteínas diferencialmente expresadas se asociaron mayoritariamente a partículas lipídicas como lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (HDL, LDL, VLDL), quilomicrones, y otros componentes relacionados con la matriz extracelular y complejos del complemento. Por último, en el análisis de enfermedades asociadas, el término más destacado fue la amiloidosis visceral familiar, seguido de enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos, como dislipidemias familiares y trastornos del metabolismo lipídico.

• Comparación entre sanos y DCL

El análisis funcional en esta comparación mostró un enriquecimiento de rutas relacionadas con la activación del sistema del complemento, la respuesta inmune humoral, la coagulación sanguínea y distintos mecanismos de defensa frente a organismos externos. Por otro lado, debido al mayor número de proteínas

en este análisis, el análisis de interacción proteína-proteína mostró una red más densa con múltiples interacciones, pero sin agrupamientos funcionales claramente definidos en torno a rutas específicas.

En cuanto a la localización celular (Figura 9), en esta comparación se observó especialmente marcada la presencia de términos como exosomas y espacio extracelular, todos con valores de significancia elevados y un alto número de genes asociados. También se detectaron partículas de origen sanguíneo, gránulos plaquetarios y otros componentes ya observados en el análisis global. Finalmente, respecto a las enfermedades asociadas, el término más destacado fue la deficiencia del complemento, seguido de la amiloidosis visceral familiar, la amiloidosis y problemas de coagulación.



Figura 9. Enriquecimiento de componentes celulares (*Gene Ontology***) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre sanos y DCL.** Se representan los términos más significativos obtenidos mediante la herramienta STRING. En el eje Y se indican los componentes celulares enriquecidos, mientras que en el eje X se muestra la puntuación de enriquecimiento (*Signal***)**. El tamaño de los círculos representa el número de genes asociados a cada término y el color indica el nivel de significancia ajustado (FDR, *False Discovery Rate*), siendo más claro cuanto mayor es la significancia.

• Comparación entre DCL y controles

Comparando estos grupos, los términos más significativos dentro del análisis de procesos biológicos (Figura 10) estuvieron relacionados con la coagulación, la reparación de tejidos y la regulación de los niveles de fluidos corporales. También aparecieron procesos inmunes, como la respuesta inmune humoral y la activación del sistema del complemento, junto con otros términos relacionados con mecanismos de defensa. Además, el análisis de interacción proteína-proteína reveló una red con conectividad entre algunas proteínas, pero sin claros agrupamientos funcionales definidos.



Figura 10. Enriquecimiento de procesos biológicos (*Gene Ontology***) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre DCL y control.** Se representan los términos más significativos obtenidos mediante la herramienta STRING. En el eje Y se indican los procesos biológicos enriquecidos, mientras que en el eje X se muestra la puntuación de enriquecimiento (*Signal***)**. El tamaño de los círculos representa el número de genes asociados a cada término y el color indica el nivel de significancia ajustado (FDR, *False Discovery Rate*), siendo más claro cuanto mayor es la significancia.

Respecto a la localización celular, los términos con mayor significancia fueron los exosomas y el espacio extracelular, ambos también observados en las comparaciones anteriores y en el análisis global. Además, se identificaron otros compartimentos ya presentes también en comparaciones previas, como partículas lipoproteicas (sanos vs controles), partículas de origen sanguíneo y componentes de la matriz extracelular (presentes en el análisis global y en sanos vs DCL), entre otros.

Finalmente, en cuanto a las asociaciones con enfermedades (Figura 11), el término más significativo fue la amiloidosis. También se identificaron otras enfermedades ya observadas en comparaciones previas, como la amiloidosis visceral familiar y trastornos de la coagulación, así como nuevos términos como trombosis.

RESULTADOS



Figura 11. Enriquecimiento de asociaciones gen-enfermedad (*DISEASES***) en el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre DCL y control.** Se representan los términos más significativos obtenidos mediante la herramienta STRING. En el eje Y se indican los asociaciones gen-enfermedad, mientras que en el eje X se muestra la puntuación de enriquecimiento (*Signal***)**. El tamaño de los círculos representa el número de genes asociados a cada término y el color indica el nivel de significancia ajustado (FDR, *False Discovery Rate*), siendo más claro cuanto mayor es la significancia.

4.4.3. Proteínas relacionadas con alzheimer identificadas mediante análisis bioinformático

A partir del análisis proteómico y la posterior revisión de scores mediante herramientas bioinformáticas como Open Targets, DisGeNET y GeneAnalyst, se identificaron varias proteínas con evidencia de asociación con la enfermedad de Alzheimer. Algunas de ellas fueron específicas de una sola comparación, como el receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad 1 (LRP1), la protectina (CD59), la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), la proteína de unión a calcio S100 A9 (S100A9), la tetraspanina-14 (TSPAN14), la anquirina-1 (ANK1), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y otras apolipoproteínas. Por otro lado, algunas proteínas, como TUBA4A, ApoC3, la fibronectina 1 (FN1), la transtiretina (TTR) y la proteína asociada a integrina CD47, se repitieron en más de un grupo.

Destacaron especialmente las apolipoproteínas, que presentaron scores elevados en el análisis bioinformático, indicando una fuerte relación con la enfermedad de Alzheimer, especialmente en la comparación entre sanos y controles. Entre ellas se encuentran la apolipoproteína C-I (apoC1), la apolipoproteína C-III (apoC3), la apolipoproteína A-IV (apoA4), la apolipoproteína B (apoB), la apolipoproteína M (apoM) y la apolipoproteína E (apoE).

Entre todas estas proteínas, apoC3 y apoE fueron seleccionadas para validación experimental, debido al gran cambio de expresión de apoC3 en dos de las tres comparaciones del análisis proteómico y a la evidencia bibliográfica que respalda el papel de apoE, así como por su conexión con otras proteínas identificadas en este análisis.

4.5. Validación experimental de proteínas clave

4.5.1. Resultados de apoC3

Los resultados de la validación de apoC3 mediante ELISA se presentan en la figura 12A, mostrando los valores medios de los resultados de ELISA en pg/mL normalizados con *No-Stain* para los tres grupos estudiados: sano, control y DCL. El grupo control mostró un valor medio de 0,98 ± 0,19, mientras que tanto el grupo sano como el grupo con DCL presentaron valores similares, de 1,30 ± 0,46 y 1,30 ± 0,31, respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico mediante ANOVA mostró un *p-value* > 0,05, por lo que las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.





En la comparación de los ratios de expresión entre grupos (Figura 12B), el valor Sano/Ctrl fue de 1,33, lo que indica un aumento en la expresión de apoC3 en el grupo sano respecto al control. De forma similar, el valor DCL/Ctrl fue de 1,34, lo que indica un aumento comparable en el grupo DCL. En cambio, el ratio Sano/DCL fue cercano a la unidad (0,99), reflejando niveles similares entre ambos grupos. Al comparar estos resultados con los ratios obtenidos mediante proteómica, se observó que solo el valor Sano/DCL mostró una tendencia similar (0,98), mientras que las otras dos comparaciones presentaron direcciones opuestas, con valores de 0,41 para Sano/Ctrl y 0,42 para DCL/Ctrl.

4.5.2. Resultados de apoE: Validación y evaluación de su localización intra o extravesicular

Para la validación de apoE, se realizaron análisis de WB para cuantificar su expresión proteica en los tres grupos de estudio (control, sano y DCL). En las imágenes obtenidas (Figura 13A-C), se identificó en todos los casos una banda en torno a los 35 kDa, correspondiente a apoE, lo que confirmó su presencia en cada grupo. Los resultados de las intensidades normalizadas se presentan en la Figura 13D, mostrando los valores medios ± desviación típica: el grupo control presentó un valor superior de 2,01 ± 0,49, el grupo sano un valor de 1,73 ± 1,01, mientras que el grupo DCL alcanzó un valor intermedio de 1,91 ± 0,62. Sin embargo, al aplicar un análisis estadístico mediante ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.





En la comparación de los ratios de expresión entre grupos (Figura 13E), el valor Sano/Ctrl fue de 0,86, indicando una ligera reducción en la expresión de apoE en el grupo sano respecto al control. Por otro lado, tanto el ratio Sano/DCL (0.91) como el ratio DCL/Ctrl (0,95) fueron cercanos a la unidad, lo que sugiere que ambos grupos presentan niveles similares de expresión. Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante proteómica, se observó una tendencia ascendente en ambos métodos (Sano/Ctrl < Sano/DCL < DCL/Ctrl), aunque en WB las diferencias entre grupos fueron menos pronunciadas, siendo los ratios obtenidos mediante proteómica de 0,63 para Sano/Ctrl, 0,76 para Sano/DCL y 0,82 para DCL/Ctrl.

Por otro lado, para estudiar la localización de apoE en las VEs (presentes como cargo, o adheridas a la membrana de las VEs), se evaluó la presencia de la proteína en diferentes condiciones de tratamiento mediante WB. La figura 14 muestra las señales obtenidas para apoE en torno a los 35 kDa. Las muestras de las fracciones 1 a 3 (F1, F2, F3), que representan las VEs aisladas sin ultracentrifugación (solo aisladas mediante SEC), mostraron una banda clara y en aumento en todos los casos.

En las muestras que fueron ultracentrifugadas (tras SEC), se observaron diferencias respecto al tratamiento con/sin proteinasa K. En la muestra de VEs sin tratamiento (PK-) se detectó una banda tenue de apoE, menos intensa que la observada en los sobrenadantes, donde no hay VEs. En cambio, en la muestra tratada con proteinasa K (PK+), la banda de apoE en torno a los 35 kDa desapareció, y se observaron dos nuevas señales: una intensa justo por debajo y otra, más débil, alrededor de los 25 kDa.



Figura 14. Localización de apoE intra o extravesicular mediante WB. Se muestran los resultados obtenidos para apoE en distintas condiciones experimentales bajo condiciones reductoras. Las siglas corresponden a las distintas condiciones del experimento: fracciones vesiculares (F1, F2, F3) representadas por duplicado, correspondiendo cada conjunto a muestras de plasma distintas, obtenidas del mismo donante. También se incluyen muestras tratadas con proteinasa K (PK+), muestras sin tratamiento con proteinasa K (PK-), sobrenadante (SN) y marcador de peso molecular (M). Los números a la izquierda indican el peso molecular en kDa.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En el análisis de las fracciones proteicas mediante NanoDrop, se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. El pico correspondiente a las VEs, que normalmente se observa en la fracción 2, apareció desplazado hacia la derecha en el grupo control, localizándose en la fracción 3, en contraste con los grupos DCL y sano. Una posible explicación de este desplazamiento podría estar relacionada con el tamaño y la concentración de las VEs. En pacientes con alzheimer y otras demencias neurodegenerativas se ha observado un mayor tamaño de las VEs plasmáticas, pero una menor concentración de estas en plasma (Longobardi et al., 2021). Por su parte, en el estudio realizado por los investigadores colaboradores en la Universidad de Antioquia (Villar-Vesga et al., 2020), se observó también un aumento en el tamaño de las VEs en pacientes con FAD, pero en este caso acompañado también de un aumento en la concentración de VEs en plasma. Otra posible causa de este desplazamiento podría ser el co-aislamiento de otras proteínas, como la albúmina, que es la proteína más abundante en plasma o lipoproteínas, las cuales también pueden interferir en la separación de VEs a partir de plasma, ya que presentan densidades y tamaños similares, dificultando su eliminación completa (Robinson et al., 2024). Por otro lado, en las fracciones 7-13, que corresponden principalmente a proteínas solubles, se observó un aumento progresivo de la absorbancia en el grupo DCL en comparación con los otros grupos, especialmente en las fracciones 10 a 13. Esto podría deberse también a un mayor co-aislamiento de proteínas plasmáticas no vesiculares de menor tamaño que podrían haber permanecido en las fracciones más tardías durante el proceso de separación. Sin embargo, al ser un aumento específico y significativo del grupo DCL, también es posible que refleje una mayor presencia de proteínas solubles relacionadas con el deterioro cognitivo leve, que podrían estar elevadas en estas muestras.

Los resultados de la validación de la presencia de VEs mediante WB utilizando los marcadores específicos CD9 y CD63, mostraron la detección de las bandas específicas en las muestras, sugiriendo un aislamiento de VEs exitoso. Sin embargo, se observaron variaciones en la intensidad de las bandas entre los grupos, lo que podría reflejar diferencias en la cantidad de VEs. No obstante, para confirmar si realmente existen estas diferencias, sería necesario normalizar los valores de intensidad de las bandas empleando la concentración proteica (mg/mL) o utilizando la señal de *No-Stain* como referencia, lo que permitiría evaluar de manera precisa si las diferencias observadas responden a variaciones reales entre los grupos o a diferencias en cantidad de VEs cargada, aunque este aspecto no fue objeto de estudio en este trabajo.

El análisis proteómico de las VEs permitió identificar 502 proteínas, de las cuales 492 fueron comunes a todos los grupos. Sin embargo, algunas proteínas no eran compartidas: tres aparecieron exclusivamente en el grupo sano, tres entre sanos y controles, y cuatro entre sanos y DCL. Aunque podría pensarse que estas proteínas no comunes podrían reflejar diferencias específicas entre los grupos, su aparición en un número reducido de muestras sugiere que podrían tratarse de proteínas "contaminantes" arrastradas durante el proceso de aislamiento, en lugar de representar un perfil diferente real.

Página 30

DISCUSIÓN

En cuanto a las proteínas diferencialmente expresadas, el mayor número de diferencias se observó en la comparación entre sanos y DCL, con 79 proteínas, seguido de la comparación entre sanos y controles, con 36 proteínas, y finalmente la comparación entre DCL y controles, con 30 proteínas. Tal y como se observó en los *volcano plots*, estas diferencias incluyen tanto aumentos como disminuciones en la expresión proteica, destacando especialmente proteínas como CLEC10A, TUBA4A y apoC3, que aparecieron en más de una comparación. Entre ellas, y aunque el análisis bioinformático mostró que la mayoría tenían alguna relación previa con la enfermedad de Alzheimer, CLEC10A, relacionada con la respuesta inmune e inflamatoria, fue la única para la que no se encontraron datos que la vincularan. Sin embargo, otro estudio también identificó a CLEC10A como una de las 20 proteínas plasmáticas más diferencialmente expresadas en monos con FAD, lo que podría indicar una alteración de esta molécula en la enfermedad (Li et al., 2024).

El análisis global de rutas biológicas en las VEs mostró que las más destacadas están relacionadas con el sistema inmune, el sistema del complemento y procesos de coagulación como la hemostasia. Estas rutas fueron significativas también tanto en la comparación entre sanos y DCL como entre DCL y controles, lo que sugiere que el perfil proteico de las VEs en el contexto de DCL respecto a los otros grupos está vinculado a procesos inflamatorios e inmunitarios. Por otro lado, las rutas más relevantes en la comparación entre sanos y controles fueron las asociadas al metabolismo lipídico y del colesterol lo que coincide con la detección de varias apolipoproteínas diferencialmente expresadas y relacionadas. Esto podría estar influido por una posible contaminación lipídica, ya que varios viales del grupo control presentaron opacidad o turbidez (lipemia), lo que sugiere la presencia de lipidemia, es decir, una acumulación de lipoproteínas en sangre, especialmente VLDL y quilomicrones (Fernández-Prendes et al., 2023). Esta situación podría explicar el aumento de algunas apolipoproteínas en el grupo control respecto a sanos, como apoB, ya que se sabe que pueden co-aislarse con VEs en técnicas como SEC (Robinson et al., 2024). No obstante, también podría indicar cambios reales en las rutas del metabolismo lipídico y del colesterol, reflejando variaciones propias del perfil lipoproteico entre estos grupos. Estos resultados coinciden de nuevo con los obtenidos en el estudio de Villar-Vesga et al., 2020, donde también se identificaron rutas vinculadas a la coagulación, el sistema del complemento, inflamación y metabolismo lipídico-carbohidratos.

En el análisis de compartimentos celulares asociados a las VEs, se destacaron principalmente los relacionados con exosomas, espacio extracelular y partículas sanguíneas, lo que concuerda con el origen de VEs plasmáticas de las muestras. En la comparación entre sanos y controles, los compartimentos más relevantes estuvieron relacionados con lipoproteínas y quilomicrones, en consonancia con las rutas identificadas. Además, las asociaciones gen-enfermedad incluyeron principalmente amiloidosis y enfermedades de coagulación, así como dislipidemia y trastornos del metabolismo lipídico, especialmente en la comparación entre sanos y controles, lo que coincide con los resultados obtenidos previamente.

DISCUSIÓN

El análisis bioinformático permitió identificar proteínas potencialmente relevantes en el contexto del alzheimer, ayudando a detectar aquellas ya descritas en estudios previos y otras menos exploradas que podrían estar implicadas en la enfermedad. Por ejemplo, entre las proteínas destacadas por su ratio de expresión y señaladas como posiblemente asociadas con el alzheimer se encuentra TUBA4A, una isoforma de la subunidad alfa de la tubulina que forma parte de los microtúbulos. Estudios previos mostraron que la modificación de esta proteína puede reducir la hiperfosforilación de tau y la activación de la microglía, lo que sugiere su potencial como diana terapéutica en tauopatías (Hausrat et al., 2022; Mol et al., 2021).

Se decidió validar apoC3 debido a su aparición destacada en el análisis bioinformático y al gran cambio de expresión observado en el análisis proteómico, donde los controles presentaron mayores niveles de apoC3 en comparación con DCL y sanos. Esto coincide con estudios previos que encontraron una disminución de apoC3 en exosomas de pacientes con alzheimer y en plasma de individuos con DCL y alzheimer respecto a controles, lo que ha llevado a considerarla como un posible biomarcador temprano. Además, se ha descrito que apoC3 es una proteína que se une a Aβ, promoviendo su eflujo y reduciendo indirectamente su depósito en el cerebro, lo que sugiere un posible papel protector. Asimismo, también se ha reportado que mayores niveles de apoC3 están correlacionados con un mejor pronóstico de la enfermedad, lo que indica que su presencia podría ser beneficiosa en fases tempranas. Sin embargo, los resultados de ELISA mostraron una tendencia opuesta, aunque no significativa, con mayor cantidad de apoC3 en VEs plasmáticas de DCL y sanos que en controles. Esta discrepancia podría deberse al uso de diferentes buffers de lisis, siendo necesario emplear técnicas adicionales para confirmar estos resultados (Soares Martins et al., 2022; Shih et al., 2014; Zhang et al., 2020).

Posteriormente, se validó apoE debido a su conocido papel en el alzheimer, ya que es una proteína multifuncional involucrada en el transporte de lípidos, la neuroinflamación y la reparación neuronal, desempeñando un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Belaidi et al., 2025). Además, en el análisis proteómico se observó una mayor expresión de apoE en controles en comparación con los sanos, lo que también se reflejó en los resultados de WB, aunque de manera menos marcada, siendo la tendencia similar en ambos casos: controles > DCL > sanos. Una posible explicación para este patrón es la posible presencia de lipoproteínas en el grupo control, lo que podría justificar los niveles más altos observados en este grupo. Esta hipótesis coincide con el resultado del análisis de la localización intra o extracelular de apoE. Tras el tratamiento con proteinasa K (PK), la banda correspondiente a apoE desapareció en comparación con el sobrenadante y el tratamiento sin PK, lo que sugiere que la mayor parte de apoE está en el plasma circundante y una pequeña fracción se encuentra unida a la superficie de las VEs, ya que, tras la ultracentrifugación y lavado de las fracciones, se seguía observado una ligera banda de apoE cuando no estaban tratadas con PK. Cabe destacar que la banda grande observada en las condiciones PK+ podría corresponder a la propia proteinasa K, ya que esta enzima presenta un peso molecular de 28,9 kDa, coincidiendo con el peso en el que aparece la señal.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Este TFG tuvo como objetivo analizar el perfil proteico de las VEs plasmáticas en tres grupos de estudio: controles no portadores, sanos asintomáticos portadores de la mutación *PSEN1* E280A y portadores de la mutación con DCL. A través del aislamiento, validación y análisis proteómico de las VEs, se buscó identificar diferencias funcionales y proteicas entre estos grupos, así como posibles biomarcadores tempranos relacionados con la progresión de la enfermedad de Alzheimer de origen familiar.

Durante el aislamiento, se observaron diferencias en la distribución de proteínas entre grupos. En particular, el pico correspondiente a las VEs apareció desplazado hacia fracciones más tardías en los controles, lo que podría deberse a variaciones en el tamaño y concentración vesicular o a la presencia de contaminantes como albúmina o lipoproteínas. También se detectó un aumento de proteínas solubles en las fracciones tardías en las muestras implicadas en la comparación con DCL, lo que podría reflejar una mayor presencia de proteínas no vesiculares o alteraciones relacionadas con el deterioro cognitivo. EL análisis proteómico identificó 502 proteínas, de las cuales la gran mayoría fueron compartidas entre los tres grupos. Sin embargo, se encontraron proteínas diferencialmente expresadas en todas las comparaciones, siendo más numerosas entre sanos y DCL. Entre las proteínas destacadas se identificaron CLEC10A, TUBA4A y apoC3, algunas de ellas con implicaciones conocidas en la enfermedad de Alzheimer, y otras, como CLEC10A, con posible relevancia aún poco estudiada. Los análisis funcionales revelaron la implicación de rutas relacionadas con el sistema inmunitario, el sistema del complemento y la coagulación en las comparaciones que incluyen al grupo DCL, mientras que las diferencias entre sanos y controles se asociaron principalmente a rutas de metabolismo lipídico, posiblemente influenciadas por la presencia de lipoproteínas. Finalmente, en la validación experimental, los niveles de apoC3 obtenidos por ELISA fueron más altos en DCL y sanos que en controles, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia no coincidió con los resultados del análisis proteómico, donde se observó una reducción de apoC3 en estos grupos frente a los controles, en línea con lo descrito en la literatura. Por su parte, apoE mostró un patrón coherente entre lo proteómico y la validación, con mayor expresión en controles. Este resultado podría explicarse por la presencia de lipoproteínas en ese grupo, lo que coincidiría con el hecho de que, tras el tratamiento con proteinasa K, apoE se detectó mayoritariamente en el entorno extracelular y en menor medida asociado a la superficie de las VEs.

A partir de estos resultados, cuyos datos se prevé publicar próximamente, se plantea como proyección futura ampliar el estudio mediante un enfoque longitudinal, analizando muestras obtenidas de los mismos individuos a lo largo del tiempo, especialmente en el grupo de portadores sanos asintomáticos. Esto permitirá evaluar si el perfil proteico de sus VEs evoluciona hacia un patrón similar al observado en los pacientes con DCL, lo que podría ayudar a identificar cambios tempranos asociados con el inicio de los síntomas.

Página 33

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Asimismo, se prevé validar experimentalmente otras proteínas de interés, tanto en portadores de la mutación como en controles no portadores. Estas validaciones incluirán también un estudio longitudinal de su expresión para determinar si presentan alteraciones con la progresión de la enfermedad. En caso de confirmarse su implicación, estas proteínas podrían convertirse en candidatas prometedoras para su estudio en la enfermedad de Alzheimer de origen esporádico.



7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, C., Agosta, F., Bozzali, M., Fougère, B., Iwata, A., Nilforooshan, R., Takada, L. T., Viñuela, F. & Traber, M. (2022). Perspectives and challenges in patient stratification in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *14*(1), 112. https://doi.org/10.1186/s13195-022-01055-y

Acosta-Baena, N., Sepulveda-Falla, D., Lopera-Gómez, C. M., Jaramillo-Elorza, M. C., Moreno, S., Aguirre-Acevedo, D. C., Saldarriaga, A. & Lopera, F. (2011). Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study. *The Lancet Neurology*, *10*(3), 213-220. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70323-9

Akbar, N., Azzimato, V., Choudhury, R. P. & Aouadi, M. (2019). Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia*, 62(12), 2179-2187. https://doi.org/10.1007/s00125-019-05014-5

Belaidi, A. A., Bush, A. I. & Ayton, S. (2025). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: molecular insights and therapeutic opportunities. *Molecular Neurodegeneration*, *20*(1), 47. https://doi.org/10.1186/s13024-025-00843-y

Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(10), 783-793. https://doi.org/10.1038/nrd2959

Chang, W.-H., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. (2021). Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. En M. Robles-Flores (Ed.), *Cancer Cell Signaling* (Vol. 2174, pp. 143-170). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0759-6_10

Cuchillo-Ibáñez, I., Andreo-Lillo, P., Pastor-Ferrándiz, L., Carratalá-Marco, F. & Sáez-Valero, J. (2020). Elevated Plasma Reelin Levels in Children With Autism. *Frontiers in Psychiatry*, *11*, 242. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00242

Cummings, J. (2021). New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *16*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s13024-021-00424-9

DeTure, M. A. & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 32. https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5

Escamilla, S., Badillos, R., Comella, J. X., Solé, M., Pérez-Otaño, I., Mut, J. V. S., Sáez-Valero, J. & Cuchillo-Ibáñez, I. (2024). Synaptic and extrasynaptic distribution of NMDA receptors in the cortex of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's & Dementia*, *20*(12), 8231-8245. https://doi.org/10.1002/alz.14125

Fernández-Prendes, C., Castro Castro, M. J., Sánchez Navarro, L., Rapún Mas, L., Morales-Indiano, C. & Arrobas Velilla, T. (2023). Manejo de muestras lipémicas en el Laboratorio Clínico. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, *4*(1), 16-27. https://doi.org/10.1515/almed-2022-0083

Gilboa, T., Ter-Ovanesyan, D., Wang, S.-C., Whiteman, S., Kannarkat, G. T., Church, G. M., Chen-Plotkin, A. S. & Walt, D. R. (2024). Measurement of α -synuclein as protein cargo in plasma extracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(45), e2408949121. https://doi.org/10.1073/pnas.2408949121

Hausrat, T. J., Janiesch, P. C., Breiden, P., Lutz, D., Hoffmeister-Ullerich, S., Hermans-Borgmeyer, I., Failla, A. V. & Kneussel, M. (2022). Disruption of tubulin-alpha4a polyglutamylation prevents aggregation of hyper-phosphorylated tau and microglia activation in mice. *Nature Communications*, *13*(1), 4192. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31776-5

Herrero-Lorenzo, M., Pérez-Pérez, J., Escaramís, G., Martínez-Horta, S., Pérez-González, R., Rivas-Asensio, E., Kulisevsky, J., Gámez-Valero, A. & Martí, E. (2024). Small RNAs in plasma extracellular vesicles define biomarkers of premanifest changes in Huntington's disease. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(10), e12522. https://doi.org/10.1002/jev2.12522

Kowal, E. J. K., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A. & Church, G. M. (2017). Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. En W. P. Kuo & S. Jia (Eds.), *Extracellular Vesicles* (Vol. 1660, pp. 143-152). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_12

Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. Al., Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A.-B., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R. & Bhat, A. A. (2024). Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 27. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1

Lalli, M. A., Cox, H. C., Arcila, M. L., Cadavid, L., Moreno, S., Garcia, G., Madrigal, L., Reiman, E. M., Arcos-Burgos, M., Bedoya, G., Brunkow, M. E., Glusman, G., Roach, J. C., Hood, L., Kosik, K. S. & Lopera, F. (2014). Origin of the *PSEN1* E280A mutation causing early-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(5S). https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.09.005

Lane, C. A., Hardy, J. & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59-70. https://doi.org/10.1111/ene.13439

Lennol, M. P., Sánchez-Domínguez, I., Cuchillo-Ibañez, I., Camporesi, E., Brinkmalm, G., Alcolea, D., Fortea, J., Lleó, A., Soria, G., Aguado, F., Zetterberg, H., Blennow, K. & Sáez-Valero, J. (2022). Apolipoprotein E imbalance in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Research & Therapy*, *14*(1), 161. https://doi.org/10.1186/s13195-022-01108-2

Li, M., Guan, M., Lin, J., Zhu, K., Zhu, J., Guo, M., Li, Y., Chen, Y., Chen, Y., Zou, Y., Wu, D., Xu, J., Yi, W., Fan, Y., Ma, S., Chen, Y., Xu, J., Yang, L., Dai, J., ... Chen, Y. (2024). Early blood immune molecular alterations in cynomolgus monkeys with a PSEN1 mutation causing familial Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *20*(8), 5492-5510. https://doi.org/10.1002/alz.14046

Longobardi, A., Benussi, L., Nicsanu, R., Bellini, S., Ferrari, C., Saraceno, C., Zanardini, R., Catania, M., Di Fede, G., Squitti, R., Binetti, G. & Ghidoni, R. (2021). Plasma Extracellular Vesicle Size and Concentration Are Altered in Alzheimer's Disease, Dementia With Lewy Bodies, and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 667369. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667369

Lopera Restrepo, F, Arcos Burgos, O, Madrigal Zapata, L, Kosik, K, Cornejo Ochoa, J y Ossa Londoño, J. (1994). Demencia tipo Alzheimer con agregación familiar en Antioquia, Colombia. Asociación Colombiana de Neurología.

Mittelbrunn, M. & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(5), 328-335. https://doi.org/10.1038/nrm3335

Mol, M. O., Wong, T. H., Melhem, S., Basu, S., Viscusi, R., Galjart, N., Rozemuller, A. J. M., Fallini, C., Landers, J. E., Kaat, L. D., Seelaar, H., Van Rooij, J. G. J. & Van Swieten, J. C. (2021). Novel *TUBA4A* Variant Associated With Familial Frontotemporal Dementia. *Neurology Genetics*, *7*(3), e596. https://doi.org/10.1212/NXG.00000000000596

Nieuwland, R. & Siljander, P. R. (2024). A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(1), e12400. https://doi.org/10.1002/jev2.12400

Pastor, P., Roe, C. M., Villegas, A., Bedoya, G., Chakraverty, S., García, G., Tirado, V., Norton, J., Ríos, S., Martínez, M., Kosik, K. S., Lopera, F. & Goate, A. M. (2003). Apolipoprotein Eɛ4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred. *Annals of Neurology*, *54*(2), 163-169. https://doi.org/10.1002/ana.10636

Perez-Gonzalez, R., Gauthier, S. A., Kumar, A. & Levy, E. (2012). The Exosome Secretory Pathway Transports Amyloid Precursor Protein Carboxyl-terminal Fragments from the Cell into the Brain Extracellular Space. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(51), 43108-43115. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404467

Pérez-González, R., Kim, Y., Miller, C., Pacheco-Quinto, J., Eckman, E. A. & Levy, E. (2020). Extracellular vesicles: where the amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments accumulate and amyloid-β oligomerizes. *The FASEB Journal*, *34*(9), 12922-12931. https://doi.org/10.1096/fj.202000823R

Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344. https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142

Quiroz, Y. T., Aguillon, D., Aguirre-Acevedo, D. C., Vasquez, D., Zuluaga, Y., Baena, A. Y., Madrigal, L., Hincapié, L., Sanchez, J. S., Langella, S., Posada-Duque, R., Littau, J. L., Villalba-Moreno, N. D., Vila-Castelar, C., Ramirez Gomez, L., Garcia, G., Kaplan, E., Rassi Vargas, S., Ossa, J. A., ... Arboleda-Velasquez, J. F. (2024). *APOE3* Christchurch Heterozygosity and Autosomal Dominant Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, *390*(23), 2156-2164. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2308583

Robinson, S. D., Samuels, M., Jones, W., Stewart, N., Eravci, M., Mazarakis, N. K., Gilbert, D., Critchley, G. & Giamas, G. (2024). Confirming size-exclusion chromatography as a clinically relevant extracellular vesicles separation method from 1mL plasma through a comprehensive comparison of methods. *BMC Methods*, 1(1), 7. https://doi.org/10.1186/s44330-024-00007-2

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., De Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S. & Van Der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet, 388*(10043), 505-517. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1

Shih, Y.-H., Tsai, K.-J., Lee, C.-W., Shiesh, S.-C., Chen, W.-T., Pai, M.-C. & Kuo, Y.-M. (2014). Apolipoprotein C-III is an Amyloid-β-Binding Protein and an Early Marker for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(3), 855-865. https://doi.org/10.3233/JAD-140111

Soares Martins, T., Marçalo, R., Da Cruz E Silva, C. B., Trindade, D., Catita, J., Amado, F., Melo, T., Rosa, I. M., Vogelgsang, J., Wiltfang, J., Da Cruz E Silva, O. A. B. & Henriques, A. G. (2022). Novel Exosome Biomarker Candidates for Alzheimer's Disease Unravelled Through Mass Spectrometry Analysis. *Molecular Neurobiology*, *59*(5), 2838-2854. https://doi.org/10.1007/s12035-022-02762-1

Song, Z., Xu, Y., Deng, W., Zhang, L., Zhu, H., Yu, P., Qu, Y., Zhao, W., Han, Y. & Qin, C. (2020). Brain Derived Exosomes Are a Double-Edged Sword in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 79. https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00079

Valle-Tamayo, N., Aranha, M. R., Pérez-González, R., Serrano-Requena, S., Videla, L., Barroeta, I., Benejam, B., Chiva-Blanch, G., Jimenez, A., Busciglio, J., Wisniewski, T., Do Carmo, S., Álvarez-Sánchez, E., Muñoz, L., Bejanin, A., Belbin, O., Alcolea, D., Carmona-Iragui, M., Lleó, A., ... Iulita, M. F. (2025). Nerve growth factor precursor alterations in neuron-derived extracellular vesicles from individuals with Down syndrome along the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's & Dementia*, *21*(4), e70137. https://doi.org/10.1002/alz.70137

Van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213-228. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125

Villar-Vesga, J., Henao-Restrepo, J., Voshart, D. C., Aguillon, D., Villegas, A., Castaño, D., Arias-Londoño, J. D., Zuhorn, I. S., Ribovski, L., Barazzuol, L., Cardona-Gómez, G. P. & Posada-Duque, R. (2020). Differential Profile of Systemic Extracellular Vesicles From Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Leads to Neuroglial and Endothelial Cell Degeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *12*, 587989. https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.587989

Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., ... Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2), e12404. https://doi.org/10.1002/jev2.12404

Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, *6*(5), 359-362. https://doi.org/10.1038/nmeth.1322

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. -M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1), 27066. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066

Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J. & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 211. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3

Zhang, X., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2020). Higher Plasma APOC-III Was Associated with a Slower Reduction of β -Amyloid Levels in Cerebrospinal Fluid Among Older Individuals Without Dementia. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *16*, 1139–1144. https://doi.org/10.2147/NDT.S238985